



TITLE:

Recognition Mechanism of Dibenzoylhydrazines by Human P- glycoprotein(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Miyata, Kenichi

CITATION:

Miyata, Kenichi. Recognition Mechanism of Dibenzoylhydrazines by Human P-glycoprotein. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20065>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	宮田 憲一
論文題目	Recognition Mechanism of Dibenzoylhydrazines by Human P-glycoprotein （ヒトP-糖タンパク質によるDibenzoylhydrazine類縁体認識機構の解明）		
（論文内容の要旨）			
<p>P-糖タンパク質（P-gp）は腫瘍細胞における多剤耐性の原因因子として見出されたABCトランスポーターの1種で、ヒトでは小腸、肝臓、脳、腫瘍細胞などで発現し、ATP依存的に異物や薬物を細胞内から細胞外に排泄するポンプとして機能している。P-gpは分子量約300～2,000の中性あるいは塩基性の多様な化合物を認識するが、その基質認識機構については不明な点が多い。Dibenzoylhydrazine類縁体（DBHs）は、昆虫生育制御剤（殺虫剤）として見出された2個のベンゼン環構造を持つ化合物である。DBHsは、ヒトP-gp精製タンパク質を用いたアッセイ系においてATP加水分解活性を示すが、実際にP-gpにより認識され輸送されているかについての知見は得られていない。そこで、本研究では、片方のベンゼン環の側鎖構造が異なる2系統のDBHs（3,5-Me₂体および2-Cl体）をモデル化合物として選択し、P-gpによるDBHsの認識機構を解明することを目的とした。主な研究内容は以下のとおりである。</p> <p>(1) DBHsがP-gpにより排泄されるかどうかについて検討した。ヒトP-gp発現細胞を用いた<i>in vitro</i>輸送試験の結果、P-gpによるDBHsの輸送は検出できなかった。高い受動的膜透過性を有する化合物の評価を<i>in vitro</i>輸送試験を用いて行った場合、P-gpによる能動輸送を検出できないことが知られている。DBHsは高い受動的膜透過性を持つため、ラットの脳移行性を指標とした<i>in vivo</i>試験を用いて、DBHsがP-gpにより排泄されるかどうかについて検討した。本試験系は、<i>in vitro</i>輸送試験より高感度に、化合物がP-gpの輸送基質となるかどうかを評価できる。その結果、DBHsのラット脳移行性は、2種類のP-gp阻害剤により有意に上昇した。従って、<i>in vivo</i>動物試験においてDBHsはP-gpの輸送基質であることが明らかになった。</p> <p>(2) DBHsのP-gp輸送能に対する阻害効果について調べた。DBHsは、<i>in vitro</i>輸送試験において、P-gpの基質であるキニジンの輸送を阻害したことからP-gpの輸送活性を阻害すると考えられた。そこで、種々の3,5-Me₂体および2-Cl体のキニジン輸送阻害活性を評価し、得られた阻害活性とDBHsの構造の関係について、定量的構造活性相関（QSAR）解析を行った。いずれの系統においても、活性に最も重要であるパラメータはlog P（化合物の疎水性）で、高疎水性の化合物ほど高活性であった。P-gpの基質結合部位は脂質二重膜の中に存在すると言われていたため、高いlog Pを持つ化合物が高阻害活性を示したのは妥当であると考えられた。さらに、3,5-Me₂体においては、他方のベンゼン環4位が誘起的に電子求引性であるほど低活性となること、2-Cl体では、他方のベンゼン環3位に電子求引性の置換基が結合するほど、また、2位に長い置換基が存在するほど活性が高くなること明らかになった。2系統間で得られたQSAR式の置換基効果が異なったことから、異なる系統の類縁体は異なる結合様式でP-gpに結合していることが示唆された。</p> <p>(3) DBHsの結合部位と結合様式について考察するために、ドッキングシミュレーションを行った。ヒトP-gpの結晶構造は明らかになっていないため、マウスP-gpを鋳型タンパク質としてヒトP-gpのモデルを作成した。ドッキングシミュレーションには高い阻害活性を示した数種のDBHsを使用した。2カ所の領域に対してドッキングを検討した結果、マウスP-gpの複合体結晶構造で基質が結合している領域（P-gp内部の高疎水性領域）ではなく、P-gpの細胞質に近いやや親水的な領域（基質の入り口として考えられている領域）に2系統のDBHsが結合し、また、両</p>			

者で結合様式は異なっていることがわかった。どちらの系統のDBHsにおいても、QSAR式で得られた電子的効果を説明できたことから、ドッキングシミュレーションの結果はQSAR 解析で得られた結果を支持するものであった。

(4) (1)-(3)で得られた知見に基づき、以下のような P-gp による DBHs の認識機構を提案した。① DBHs は疎水的相互作用により脂質二重膜へ分配する。② P-gp の細胞質に近いやや親水的な領域に、電子的相互作用により結合する。③ P-gp 内の空洞を通り、疎水領域に移動する。④ ATP の加水分解によって得られたエネルギーを駆動力として P-gp のコンホメーションが変化し、排泄される。

抗がん剤や中枢を標的とした創薬において、候補化合物は P-gp に認識されない方がよいと考えられる。候補化合物の疎水性を高めた場合、高い薬理効果が期待できる一方で、毒性もまた強めてしまうリスクが存在する。従って、候補化合物の構造を最適化するには、疎水性を維持したまま化合物のファーマコフォアを変化させる必要がある。本研究で得られた QSAR をベースとしたファーマコフォアモデルは、創薬あるいは抗がん剤の多剤耐性機構を解明する上で有益な情報になり得ると考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

P-糖タンパク質 (P-gp) は、ヒト体内に異物や薬物が吸収されたときにそれらを体外へ排泄する役目を担っており、化学物質のヒトにおけるリスク評価を検討する上で、代謝酵素とともに重要なタンパク質である。また、医薬分野では多様な抗がん剤を排泄するため、腫瘍細胞における多剤耐性の原因因子として知られている。しかし、どのような構造の化合物でも排泄するわけではなく、その基質認識機構については不明な点が多い。これまで、P-gpの基質として知られていたのは医薬が中心であったが、本研究では、殺虫剤DBH類縁体を用いて、P-gpの基質認識機構の一端を解明したという点で注目に値する。本論文の評価すべき主な点は以下の通りである。

(1) *In vitro* 輸送試験より高感度なラットの脳移行性を指標とした *in vivo* 試験を用いて、DBHs がP-gp の輸送基質であることを明らかにした。

(2) 2系統のDBHsを用いて、それらのP-gp によるキニジン (P-gp の基質) 輸送に対する阻害効果について調べ、得られた阻害活性と DBHs の構造の関係についてQSAR解析を行った。その結果、いずれの系統においても、活性に最も重要であるパラメータは化合物の疎水性であること、また、2系統間で、得られたQSAR式の置換基効果が異なることを見出した。このことから、異なる系統の類縁体は異なる結合様式で P-gp に結合している可能性を示唆した。

(3) DBHs の結合部位と結合様式について考察するために、コンピューター上でヒト P-gp のモデルを作成し、このモデル構造に対して、高い阻害活性を示した数種のDBHsのドッキングシミュレーションを行った。その結果、QSAR 解析で得られた結果を支持する、P-gp上の新たな結合領域を見出した。

(4) (1)-(3)の知見に基づき、P-gp による DBHs の認識機構を提案した。これまで、マウスP-gp-基質複合体の結晶構造を元に、基質は疎水領域に結合すると考えられていたため、本研究で提案された2段階の認識機構はまったく新しいものである。

以上のように、本論文は、医農薬のデザインや抗がん剤の多剤耐性機構解明に対して有用な知見を与えており、環境毒性学、農薬化学、および医薬化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年9月21日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)